

マボヤ (*Halocynthia roretzi*) 体壁筋の収縮および弛緩時における微細構造

著者	篠原 よし子
号	834
発行年	1983
URL	http://hdl.handle.net/10097/24544

氏名・(本籍)	しの はら 篠 原 よ し 子
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	理 博 第 8 3 4 号
学位授与年月日	昭 和 58 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程) 生物学専攻
学 位 論 文 題 目	マボヤ(<i>Halocynthia roretzi</i>)体壁筋の収縮および弛緩時における微細構造
論文審査委員	(主査) 教 授 小 西 和 彦 教 授 樋 渡 宏 一 教 授 長 内 健 治

論 文 目 次

第一章 序 論

第二章 短縮時における細胞内構造

- 1) 序 論
- 2) 材料と方法
- 3) 結 果
- 4) 考 察

第三章 第尺性収縮時および等張性収縮時の微細構造

- 1) 序 論
- 2) 材料と方法
- 3) 結 果
- 4) 考 察

第四章 総合考察

第五章 要 約

論文内容要旨

序 論

平滑筋組織が腔腸動物より高等なあらゆる動物の様々な器官に分布することは光学顕微鏡の時代よりよく知られていたが、筋細胞内の微細構造についての研究は横紋筋に比べるとかなりおくれ、myosin よりなる太い filament および actin より細い filament の両方の存在が確実なものになったのは、1968年の Kelly らの報告からであった。これら両 filament は、平滑筋では細胞長軸に平行に並んではいるものの、配列は random で、横紋筋の sarcomere の様な規則正しい構造は持っていない。それなので、横紋筋について Huxley が提唱した sliding theory に基づいて、両 filament の相互的位置関係から、発生張力の大きさを説明することは、平滑筋では難しい。現時点では、平滑筋においても、横紋筋同様に actin, myosin の相互作用が収縮の本質であると考えられているが、構造上の決定的な証拠はまだ報告されていない。最近になって脊椎動物の平滑筋を用いて、actin, myosin の相互作用によって生じた張力は、細胞内に散在する dense body や網目状に存在する 10nm filament を介して細胞膜に伝えられるというモデルが提案されたがこれもまだ広く受け入れられてない状況である。

今回著者が用いた原索動物マボヤ *Halocynthia roretzi*, は、幼生時には活発に遊泳するが、やがて付着生活に入り二重の体壁筋層を持つ成体になる。この体壁筋は、細胞内に径 18~20nm の太い filament, 径 10nm の中間 filament, および 8nm の細い filament を持つ平滑筋細胞より構成される。この平滑筋は海産のものとしてはめずらしく paramyosin を含まず、又脊椎、無脊椎動物を通して平滑筋では唯一 troponin T, I, C 3 成分を含む。更には多核であり異例の平滑筋である。著者はこの興味深い動物の体壁、平滑筋を用いて、細胞の機能すなわち収縮、弛緩と微細構造の関係を明らかにしようとした。又、マボヤ体壁筋については、生化学的研究が活発に行なわれているが、著者は生理的性質を知ることにも試みた。

短縮時における細胞内構造

マボヤ体壁・平滑筋を筋束の状態では体外に切り出すと、生体長の 50% 程の長さに短縮し、自力ではもとの長さにもどらない。この状態の筋束を電顕で観察すると、細胞中央部に高電子密度構造がきまって観察された。又同じ試料の切片をトルイジン・ブルーで染色し光顕で観察すると、高電子密度構造に相当する部分は、よく染色された細胞質の塊りとして観察された。この構造は短縮した筋束を人工的に引き伸ばした試料では観察されなかった。筋細胞を収縮する条件下に置いた場合、果してこの構造が出現できるかどうか、を確認するため、この体壁筋より平滑筋細胞を単離し、更に単離細胞を chemically skinned fiber にして細胞内の myofilament に直接 ATP と Ca^{2+} を作用させ、細胞の様子を観察した。

まず筋束を 1 mg/ml collagenase で 0 °C 3 時間処理し、筋細胞間の結合組織を消化して個々の細胞を単離した。次に得られた単離細胞を 0.05% tritonx-100 を含む contracting medium

(2mMATP, 0.5mM CaCl_2) かあるいはrelaxing medium (2mM ATP, 2mM EGTA) に suspend し、細胞内の myofilament に直接収縮・弛緩の条件を与え、ノマルスキー微分干渉顕微鏡で細胞の観察を行った。その結果、弛緩条件下では細胞は長さ600 μm 程で、細胞質は特に凝集はしなかったが、収縮条件下では長さ200 μm 程になり、細胞内に数ヵ所大きな細胞質の凝集塊が観察された。この凝集塊は短縮した筋束の切片を光顕で観察した際に濃く染色された部分によく似ており、同じ試料を電顕で観察した場合の高電子密度構造に相当するものと思われた。

又、この高電子密度構造が何から構成されているのかを調べた。切り出したマボヤ体壁の平滑筋束を人工海水中に放置して十分に短縮させ、その後グリセリンあるいはサポニンで処理して細胞膜に孔をあけ、myosin を抽出する条件 (0.6M KCl 5mM MgCl_2 , 2mM EGTA, 5mM ATP, 10mM HEPES pH7.4) で 0 $^\circ\text{C}$, 0～6 時間処理し、上清に抽出される蛋白質と、筋束内の微細構造変化を調べた。6 時間抽出後、上清には actin, myosin, tropomyosin を中心とした蛋白質が抽出された。又、抽出処理を行わなかった時には筋束の細胞内に数ヵ所観察された高電子密度構造は、抽出時間と共に消失し、6 時間処理した後の筋束内は、ほとんど均一の電子密度を呈した。

以上の結果より、高電子密度構造は収縮に関与する構造蛋白質より構成されることがわかった。

第尺性収縮時および等張性収縮時の微細構造

マボヤ体壁筋の筋束を用いて等尺性収縮および等張性収縮を測定した。又、収縮・弛緩各段階の微細構造を観察した。

体壁より切り出した筋束を径200 μm 程に細くし、等尺性の張力計(photo-diode を併用した isometric transducer) に接続し、人工海水中で安定させた後人工海水を、高濃度の K^+ か、20～100 μM の ACh を含む人工海水に交換して張力を発生させた。55.4 mM の K^+ (通常の人工海水の Na^+ の10%を K^+ に置換したもの) を作用させたところ約0.8 kg/cm^2 , 147.4 mM の K^+ (30%の Na^+ を K^+ に置換) で約1.3 kg/cm^2 の最大張力を発生し、それ以上置換しても発生する最大張力に変化はなかった。このように高濃度の K^+ を筋束に作用させると、20～40秒で最大張力に達し洗浄しなければ30～40分で弛緩状態にもどった。最大張力は個体によって差があったが、平均0.68 kg/cm^2 であった。又、 K^+ 拘縮等尺性収縮は、多くの場合二相性を示した。 K^+ 拘縮をおこす際に TTX を含む K^+ 人工海水を用いると、二相性の収縮も一相性にかえる例が見られた。

ACh による張力の発生は10 μM ACh を含む人工海水で2.2 kg/cm^2 , 20 μm で3.9 kg/cm^2 の最大張力を発生し20 μM 以上は変化がなかった。ACh を筋束に作用させると、10～30秒程で最大張力に達し、洗浄なしで数分以内に弛緩状態にもどった。最大張力は上記のように 4 kg/cm^2 に達するものもあったが、平均して0.55 kg/cm^2 であった。収縮は一相性かつ一過性で、又 TTX の効果は見られなかった。

等張性収縮の測定は厚さ 1 mm 以下、幅 2 mm、長さ 2 cm 程の比較的大きな筋束を用い、キモグラフィオン記録計を使用して行った。収縮は、等尺性収縮同様、高濃度の K^+ 、および $20\mu M$ ACh を含む人工海水でおこした。 Na^+ の 50~70% を K^+ に置換した人工海水を作用させると、ただちに収縮しはじめたが、完了するまでに 3 分程かかり、洗浄なしではほとんど弛緩しなかった。洗浄した場合、30 分程で弛緩した。この弛緩には、かける負荷の大きさが影響した。又、 $20\mu M$ ACh を作用させた場合、液交換と同時に収縮しはじめ、15 秒内に収縮を完了し、洗浄なしに 18 分程で弛緩を完了した。が、中には K^+ の時と同様になかなか弛緩しないものも見られた。

更に、上記の測定を行ないながら、収縮・弛緩の各段階で筋束を固定一包埋し、電顕観察を行なった。結果としては、張力発生前、あるいは張力発生後十分に弛緩した後の筋束では、filament は、すべて細胞長軸に平行に、細胞内に均一に散在していたが、等尺性張力を発生している筋束では、filament が細胞長軸により平行に走っている細胞と、内部に高電子密度構造を持つ細胞とが観察された。これは、張力を発生している筋束内に、細胞の形をかえずに実際に張力発生に参加している細胞と、隣接している細胞から負荷を受けながらも、ある程度短縮している細胞とが存在し、後者に高電子密度構造が含まれると判断した。又、等張性収縮をおこし短縮した筋束内では、高電子密度構造を持つ細胞が多く観察された。以上の結果から、細胞の等尺性の張力の発生には高電子密度構造は関与しないが、細胞が等張性に収縮し、短縮した場合には高電子密度構造が出現し、この構造が細胞の短縮に何らかの関係を持つことが示唆された。

考 察

単離されたマボヤ体壁平滑筋細胞を収縮する条件下に置くと、細胞は短縮し、細胞内には細胞質の凝集塊が観察された。そしてこの凝集塊は短縮した筋束を電顕で観察した際に見られる高電子密度構造に相当することがわかった。この構造は人工的に引き伸ばした筋束では観察されず、又等尺性に張力を発生していると考えられる細胞でも見られなかった。これらの結果を考え合わせると、この平滑筋では、myosin および actin filament の相互作用によって張力が発生しさらにこれらの myofilament が 10nm filament をまきこんで高電子密度構成を形成し、強く短縮すると推察できる。高電子密度構造の形成については、弛緩前の myosin, actin filament が正確には平行に配列しておらず、収縮によってある程度 sliding すると、それらがぶつかりあうか、あるいは myosin, actin いずれかの filament に極性があり、sliding に限界がある等の理由で、相互作用した actomyosin filament が 10nm filament をまきこんで折りたたまれると考えることができる。又、短縮した筋束では高電子密度構造以外に細胞周辺部に細い filament の集合が見られるが、これは、折りたたまれた actomyosin filament ——高電子密度構造の形成——に基づく張力を直接細胞膜に伝えるものであろう。

この論文では、前述のように多核で、troponin 3 成分を持ち、paramyosin を持たないという異例の平滑筋であるマボヤ体壁筋を材料として用い、その生理学および形態学的な多くの性

質を明らかにした。この動物は、系統的に脊椎動物と無脊椎動物の中間に位置し、又、この体壁筋も脊椎動物の平滑筋と横紋筋の両方の特徴を合わせ持つ性質があり、筋収縮の機構を知る上での今後の材料としても興味深いと思われる。

論文審査の結果の要旨

本論文は、マボヤ (*Halocynthia roretzi*) 体壁筋の収縮による微細構造変化を電子顕微鏡を用いて追跡し、また、この筋の重要な生理的性質の 2, 3 を明かにしたものである。著者らのこれ迄の研究により、マボヤ体壁筋は平滑筋と横紋筋の中間に位置する新しいタイプの筋とも言える、異例の平滑筋であることが知られている。この筋の収縮による微細構造変化やその生理学的性質を明かにすることは、単にこの特異的な筋の詳細な理解に役立つだけでなく、平滑筋と横紋筋の機能上の相違を解明するのに重要である。

著者は体外に切り出した短縮状態にある筋が細胞内に高電子密度構造を持つことに注目し、この構造形成と生理的収縮との関連を明かにしようとした。まずコラゲナーゼ処理で単一筋細胞を単離することに成功した。この筋細胞を化学収縮させて、高電子密度構造に相当する細胞質塊が出現することを観察している。次に筋束を用い、収縮弛緩の諸段階の微細構造を検討し、高電子密度構造は等尺性収縮および弛緩状態の筋にはみられず、等張性収縮をした筋に見られる構造であることを明かにしている。ミオシン抽出液で処理すると、この構造は消失し、同時にミオシン、アクチン、トロポミオシンなどが抽出されることも確認している。著者はこれらの結果をもとに、上記の高電子密度構造の形成は生理的収縮に直接関連するものであると結論し、相互作用したミオシンフィラメントとアクチンフィラメントがさらに 10 nm フィラメントを巻き込んで凝集塊を作ると推論している。さらにこの筋の収縮、張力発生の形態学的機構に仮説を提示している。

一方、この筋の K^+ 拘縮等尺性および等長性収縮、アセチルコリン拘縮等尺性および等長性収縮を測定し、最大張力および張力発生速度、収縮速度が通常の横紋筋より小さいことを明かにした。これらの結果は筋収縮および収縮調節機構の研究に重要な知見を加えたもので、著者が自立して研究を行いうる研究能力と学識を有することを示すものである。

よって篠原よし子提出の学位論文は理学博士の学位論文として合格と認める。